

Page 10 11 JAN 2005 10/537075

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 25 JAN 2005

PCT

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000054106	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/13367	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27.11.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 02.12.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/63		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

BEST AVAILABLE COPY

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheids
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 13.05.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 24.01.2005
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div>	Bevollmächtigter Bediensteter Giebeler, K Tel. +49 89 2399-8546



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-36 in der ursprünglich eingereichten Fassung

das Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten

1-21 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-15 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Zeichnungen, Figuren

1 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/13367

- ☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-15 |
| | Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-15 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-15 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die Dokumente D1 bis D5 aus dem Stand der Technik werden im folgenden gemäß ihrer Reihenfolge im internationalen Recherchenbericht numeriert.
2. Die Gegenstände der Ansprüche 1-15 werden im Hinblick auf den bekannt gewordenen Stand der Technik als neu und erfinderisch angesehen.

Das Dokument D1 beschreibt ein prokaryotisches Expressionssystem unter Verwendung des L-Rhamnose induzierbaren $rhaP_{BAD}$ Promotors aus E. coli. Es wird ausgeführt, dass in E. coli L-Rhamnose über ein Transportsystem (RhaT) aktiv in die Zellen aufgenommen, mit einer Isomerase (RhaA) in L-Rhamnulose überführt wird, welche weiter durch eine Kinase (RhaB) phosphoryliert wird (Seite 33, Spalte 2). Das Dokument weist darauf hin, dass Rhamnose ein relativ teurer Zucker ist, und daher das *rhaB*-Gen, das die Rhamnulosekinase kodiert, gezielt inaktiviert wurde, wodurch die zur Induktion erforderliche Menge an Rhamnose gesenkt werden konnte. Die Verwendung eines Rhamnose-negativen Stammes, insbesondere eines *rhaB*-negativen Stammes, wird vor allem für Fermentationen, die als Fed-Batch-Verfahren durchgeführt werden, empfohlen (Seite 35, Spalte 1). Auch in dem Dokument D2 wird ein prokaryotisches Expressionssystem unter Verwendung des L-Rhamnose induzierbaren $rhaP_{BAD}$ Promotors und einer *rhaB*-defizienten Wirtszelle offenbart.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich hiervon dadurch, dass eine Wirtszelle, welche **defizient in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase** ist, verwendet wird.

Vom Anmelder wurde argumentiert, dass Beispiel 8.2 der Anmeldung belege, dass bei Ausschalten der Rhamnose-Isomerase auch bei Kultivierung im Fermenter die zugesetzte Rhamnose nicht verstoffwechselt wird, wohingegen aus D2 (siehe insbesondere Seite 100, linke Spalte) hervorgehe, dass bei Kultivierung im Fermenter bei einer Rhamnose-Konzentration von 0,5 g/l die Rhamnose fast vollständig von den Zellen aufgenommen wird. Dieser Argumentation kann im wesentlichen gefolgt werden.

Folglich wird die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe in der Bereitstellung verbesserter Verfahren zur Expression von Nukleinsäuren in prokaryotischen Wirtszellen unter Verwendung des rhaP_{BAD} Promotors gesehen.

Die Lösung dieser Aufgabe durch die Bereitstellung des Verfahrens nach Anspruch 1 wird als erfinderisch angesehen, weil es für den Fachmann im Hinblick auf D1 oder D2 nicht zu erwarten war, dass das Ausschalten des Isomerase Gens Vorteile im Vergleich zum Ausschalten des Kinase Gens haben würde. Somit kann für die Ansprüche 1-15 eine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2003/013367



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0000054106	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/013367	International filing date (day/month/year) 27 November 2003 (27.11.2003)	Priority date (day/month/year) 02 December 2002 (02.12.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/63		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13 May 2004 (13.05.2004)	Date of completion of this report 24 January 2005 (24.01.2005)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/EP2003/013367

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-36 - 1-21, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 1-15, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 03/13367

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Prior art documents D1 to D5 are as cited in the International Search Report (the numbering follows the order in which they are listed).
2. The subject matter of claims 1 to 15 is considered novel and inventive in relation to the searched prior art.

Document D1 describes a prokaryotic expression system that uses the L-rhamnose-inducible rhaP_{BAD} promoter from *E. coli*. It is stated that in *E. coli*, L-rhamnose is actively absorbed into the cells by a transport system (RhaT) and converted by an isomerase (RhaA) into L-rhamnulose, which is then phosphorylated by a kinase (RhaB) (see page 33, column 2). D1 points out that rhamnose is a relatively expensive sugar, and that for this reason the *rhaB* gene that encodes rhamnulose kinase was selectively inactivated, thereby reducing the amount of rhamnose needed for induction. The use of a rhamnose-negative strain, in particular a *rhaB*-negative strain, is recommended, especially for fermentations carried out as fed-batch processes (column 35, column 1). Document D2 also discloses a prokaryotic expression system that uses the

L-rhamnose-inducible rhaP_{BAD} promoter and a rhaB-deficient host cell.

The subject matter of claim 1 differs from the above in that a host cell which is **deficient in L-rhamnose isomerase** is used.

According to the applicant, example 8.2 of the application is evidence that, even in the case of cultivation in a fermenter, if rhamnose isomerase is excluded the added rhamnose is not metabolised, whereas D2 shows (see in particular page 100, left-hand column) that in the case of cultivation in a fermenter with a rhamnose concentration of 0.5 g/l the rhamnose is almost completely absorbed by the cells. This argument is basically tenable.

The problem addressed by the present invention is therefore seen as that of providing an improved method for expressing nucleic acids in prokaryotic host cells using the rhaP_{BAD} promoter.

The solution involving the method according to claim 1 is considered inventive because a person skilled in the art would not expect, in the light of D1 or D2, that excluding the isomerase gene would have advantages over excluding the kinase gene. An inventive step can therefore be acknowledged for claims 1 to 15.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.